

JUDYTA PIÓRCZYK<sup>1</sup>  
BARTOSZ JASIONOWSKI<sup>2</sup>  
EWA STAŃCZYK<sup>3</sup>

Kielce University of Technology

<sup>1</sup> jpiorczyk@tu.kielce.pl

<sup>2</sup> jasionowskibartosz@gmail.com

<sup>3</sup> ewajaroszek1@interia.pl

## A BRIEF OVERVIEW OF THE APPLICABILITY OF FISH METHODS IN ENVIRONMENTAL ENGINEERING

### Abstract

*Fluorescent in situ hybridization (FISH) is a commonly used method for the detection of microorganisms in heterogeneous environment. It is primarily used for quantitative analysis of microorganisms. FISH gives possibilities of evaluating activities of some bacteria and their physiological state in the environment. In the recent years, fluorescent in situ hybridization has been improved and adapted for the research on environmental samples.*

**Keywords:** FISH (fluorescence in situ hybridization), technological research, environmental protection

### 1. Introduction

The molecular methods which are commonly used in medicine are increasingly used in environmental research. Although the implementation of many of them is a very time-consuming project, it appears to be profitable. The molecular method for microorganisms detection does not require medium for microbiological culture, which gives the possibility of an opportunity to expand range of analyzed bacteria. In addition, the analysis of a genetic material has a high repeatability and sensitivity. In environmental engineering, FISH is a new method which allows to make quantitative and qualitative characterization of the taxonomic structures of bacteria without the need for cultures. Originally developed in 1969, the FISH method was used for detection of nucleotides. Since 1980, the number of applications of this method in the research has increased, mainly due to the development of epifluorescence microscope associated with digital image processing [8]. Initially the method was used for detection of the presence or absence of the specific DNA sequences in chromosomes. Since the results of Amman et al. [3], this method has been applied in the studies of environmental samples. This article presents increasingly use of the FISH method.

### 2. Overview of the FISH methods

In the FISH method a specific fluorescent probes are used, prepared in the way that makes them complementary to DNA or RNA to be detected. These probes are labeled with fluorophores, fluorescent dyes, which allow the detection of the microorganisms to use the epifluorescence microscopes.

In research on bacteria the detection of 16S and 28S rRNA is mainly used, for which oligonucleotide probes (usually 15 to 30 nucleotides) are designed with fluorescent marker linked on the 5'-end. Markers are unimolecular dyes such as fluorescein, Oregon Green, Texas Red, indocarbocyanine, Nile red, Cy3 or Cy5 [15], [9]. Currently, probe creation is not a complicated process. The probe creation is an integration of the selected dye with the oligonucleotides complementary to genetic material to be marked. The databases useful in this area can be found on <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Many companies offer the production of selected fluorescent probes.

The basic FISH protocol includes four main steps. The first step is a conjugation and permeabilisation of the sample on the microscope slide. Second part is a probe hybridization with the material to be examined, which is preceded by denaturation of both target DNA/

RNA and probe. The hybridization conditions are adjusted accordingly in order to achieve a compromise between the nature and intensity of the signal and preservation of the morphology of the sample. This step may last several hours. The third step is rinsing of the material in order to wash out the unbound probes, probes nonspecifically bound to the target material and probes bound with not complementary, free bases. The last step involves detection with fluorescence microscope, immunochemical detection or by using a flow cytometry [15]. At present, the confocal and fluorescence microscopes are most commonly being used for detection. In these types of microscopes, the sample is illuminated with light of a suitable wavelength, which is absorbed by the fluorophore which then emits the beam of a higher wavelength, which is received by the detector and processed to an image. It should be remembered that many samples have self-luminous objects, and illumination beam should only stimulate the appropriate dyes [6]. For detection with fluorophores, the photobleaching of the sample should also be taken into account, such fast and efficient work and good knowledge of microscope handling are required. FISH is a relatively quick method in which results are available after few hours. It can be combined with standard methods of microorganisms counting.



Fig 1. Fluorescent Microscopy Research Position at Kielce University of Technology

In some materials structures showing autofluorescence may be present, which significantly disrupts and falsifies results. This effect might be eliminated – a special substance should be added during the separation of the sample in order to reduce the non-specific background signal. However, very often these methods are not sufficient. Increasingly, the images obtained by the FISH method are processed numerically, using the specialist computer software.

Increasing number of markers used in one experiment hinders the efficient detection of appropriate structures.

Using more than one dye, it should be chosen well, taking into account the intensity of the fluorophores emission and the possibility of overlapping of light signals derived from various dyes. The first two-color detection was carried out by the research team Hopmann et al in 1986 [15].

Microsensors combined with FISH are used in research of biological activity in the biofilms [4]. *Cyanodotoryl tetrazolinum chloride* (CTC) with FISH is used for detection of activity of aerobic bacteria. CLASI-FISH (combinatorial labeling and spectral imaging) and DOPE-FISH (double labeling of oligonucleotide probes) appeared to be useful in identification of many microorganisms simultaneously [18], [5]. One of the newest variations is RCA-FISH (rolling circle amplification) used for detection of the genes responsible for denitrification process [19]. Probably the safest of FISH methods is FISH-BrdU (*5-bromo-2-deoxy-uridine*) [12]. FISH-DVC (direct viable count) is a method used in the research of water with small number of bacteria [10].

### 3. Conclusion

The FISH method is used in medical research of many types of cells and tissues [14]. It is a basic technique in cytogenetic research such as chromosome mapping, identification of mutation site in karyotype [13], [1], in the research on neoplastic cells, and with PCR (polymorphism chain reaction) is used in preimplantation diagnosis and prenatal testing.

In environmental engineering, fluorescence in situ hybridization is used in identification and visualization of the species (bacteria) in environmental research. It is used to determine morphology and species composition of the soil, surface water [16], [2], the marine and oceanic bacterioplankton [11], and research on activated sludge and biofilms formed on surfaces in contact with natural or technological water or with waste [17]. It is possible to determine the structure of flocks and granules of activated sludge using FISH. Research on the active sludge is hindered by the uniqueness of the sludge structure [7], its extensive surfaces, and spatially heterogenic chemical composition and morphology. For this reason, in comparison with the number of articles about use of the method in medicine, there are relatively few papers concerning FISH method used in research on active sludge structure.

### Acknowledgement

We are most grateful to Professor Janusz Łomotowski of Kielce University of Technology for his time, support, guidance and corrections.

## References

- [1] Alba E. Vegaa, Teresa Alarcónb, Diego Domingob, Manuel López-Brea.: *Detection of clarithromycin-resistant Helicobacter pylori in frozen gastric biopsies from pediatric patients by a commercially available fluorescent in situ hybridization*, Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 59, 2007.
- [2] Smyłka A.: *Zagrożenia bakteryjne wód powierzchniowych*, Zakład Mikrobiologii i Biotechnologii Akademii Jana Długosza Częstochowa.
- [3] Amann R.I., Binder B.J., Olson R.J., Chisholm S.W., Devereux R., Stahl D.A.: *Combination of 16S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes with Flow Cytometry for Analyzing Mixed Microbial Populations*, Appl. Environ. Microbiol., 1990.
- [4] Aoi Y.: *In Situ Identification of Microorganisms in Biofilm Communities*, J. Biosci. Bioeng., 2000.
- [5] Behnam F., Vilcinskas A., Wagner M., Stoecker K.: *Straightforward DOPE-FISH Method for Simultaneous Multicolor Detection of Six Microbial Populations*, Appl. Environ. Microbiol., 2012.
- [6] Carl Zeiss Microscopy GmbH, Operating manual LSM 700. May 2012.
- [7] Delatolla R., Tufenkji N., Comeau Y., Lamarre D., Gadbois A., Berk D.: *In situ characterization of nitrifying biofilm: Minimizing biomass loss and preserving perspective*, Wat. Res., 2009.
- [8] Jeffrey M. Levisky And Robert H. Singer.: *Fluorescence in situ hybridization: past, present and future*, Journal of Cell Science 116, 2003.
- [9] ZWIRGLMAIER KATRIN.: *Fluorescence in situ hybridisation [FISH] – the next generation*. FEMS Microbiology Letters 246, 2005.
- [10] Larsson S., Mezule L., Juhna T.: *Applicability of biofilm sampling for detection of pathogens in drinking water distribution networks*. Data from coupons and concentration methods. TECHNEAU, D.3.8.3, March 2009.
- [11] Michael Neumann, Detlef Gabel.: *Simple Method for Reduction of Autofluorescence in Fluorescence Microscopy.*, J Histochem Cytochem 2002.
- [12] Moralli D., Monaco Z.L. *Simultaneous Detection of FISH Signals and Bromo-Deoxyuridine Incorporation in Fixed Tissue Cultured Cells*. PLoS ONE, 2009.
- [13] Pinkel D.: *Fluorescence in situ Hybridization with Human Chromosome-Specific Libraries: Detection of Trisomy 21 and Translocations of Chromosome 4*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1988.
- [14] Poppert, Sven, Riecker, Melanie, Essig, Andreas. *Rapid identification of Propionibacterium acnes from blood cultures by fluorescence in situ hybridization*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 66, 2010.
- [15] Rudolf Amann, Bernhard M Fuchs, Sebastian Behrens.: *The identification of microorganisms by fluorescence in situ Hybridisation*. Current Opinion in Biotechnology 2001.
- [16] Stefano Fazi, Stefano Amalfitano, Ilaria Pizzetti, Jakob Pernthaler.: *Efficiency of fluorescence in situ hybridization for bacterial cell identification in temporary river sediments with contrasting water content*, Systematic and Applied Microbiology 30, 2007.
- [17] Traczewska T.M., Sitarska M.: *Development of biofilm on synthetic polymers used in water distribution*. Environ. Prot. Eng., 2009.
- [18] Wagner M., Haider S.: *New trends in fluorescence in situ hybridization for identification and functional analyses of microbes*. Curr. Opin. Biotechnol., 2012.

Judyta Piórczyk  
Bartosz Jasionowski  
Ewa Stańczyk

# KRÓTKI PRZEGLĄD ZASTOSOWAŃ METOD FISH W INŻYNIERII ŚRODOWISKA

## 1. Wstęp

Metody badań molekularnych powszechnie wykorzystywane w medycynie coraz częściej znajdują zastosowanie w badaniach środowiskowych. Chociaż wdrożenie wielu z nich jest bardzo czasochłonnym przedsięwzięciem, okazuje się to opłacalne. Molekularne metody detekcji mikroorganizmów nie wymagają hodowli drobnoustrojów na podłożach bio-

logicznych, dzięki czemu możliwe jest rozszerzenie zakresu analizowanych bakterii. Analiza materiału genetycznego dodatkowo charakteryzuje się dużą powtarzalnością i czułością. FISH w inżynierii środowiska jest nową metodą umożliwiającą jakościową i ilościową charakterystykę struktur taksonomicznych bakterii bez konieczności ich hodowli. Pierwotnie, odkryta w 1969 roku, metoda FISH służyła do detekcji nukleotydów. Począwszy od 1980 roku

wzrosła liczba zastosowań tej metody w badaniach, głównie dzięki rozwojowi mikroskopów epifluorescencyjnych skojarzonych z cyfrową obróbką obrazów [8]. Stosowana pierwotnie do wykrywania obecności lub braku specyficznych sekwencji DNA w chromosomach począwszy od wyników prac Ammana i in. [3] znalazła zastosowanie do badań próbek środowiskowych.

## 2. Przegląd metod FISH

W metodzie FISH stosowane są specyficzne sondy fluorescencyjne przygotowane w taki sposób, iż są komplementarne do odcinków DNA lub RNA, które chcemy oznaczyć. Sondy te są znakowane fluoroforami, barwnikami fluorescencyjnymi, dzięki którym jest możliwa detekcja mikroorganizmów z wykorzystaniem mikroskopów epifluorescencyjnych.

W badaniach bakterii wykonuje się przeważnie detekcję 16S lub 23S rRNA, do których są projektowane sądy oligonukleotydowe z przyłączonymi znacznikami fluorescencyjnymi. Znacznikami są jednocząsteczkowe barwniki np. fluoresceiny, Oregon Green, Texas red, indokarbocyaniny, Nile red, Cy3 czy Cy5 [15], [9].

W podstawowym protokole wymienione są cztery procesy. Pierwszym etapem jest połączenie i permeabilizacja próbki na szkiełku mikroskopowym, drugim jest hybrydyzacja sondy z badanym materiałem, proces ten jest poprzedzony denaturacją zarówno badanego DNA/RNA jak i sondy. Trzecim procesem jest przymywanie materiału w celu wypłukania niezwiązanych sond, niespecyficznie związanych z materiałem badanym, oraz związanych z niezupełnie komplementarnymi, wolnymi zasadami. Ostatni, czwarty etap obejmuje detekcję za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego, metod immunochemicznych, bądź z wykorzystaniem cytometru przepływowego [15]. Obecnie głównie dokonuje się detekcji za pomocą mikroskopów epifluorescencyjnych lub konfokalnych.

W niektórych materiałach mogą występować struktury wykazujące autofluorescencję znacznie zakłócającą i fałszującą wyniki. W celu eliminacji tego zjawiska w czasie izolacji próbek dodaje się specjalnych substancji, dzięki czemu zmniejsza się niespecyficzny sygnał tła. Bardzo często metody te jednak nie są w pełni wystarczające. Coraz częściej obrazy uzyskiwane metodą FISH poddaje się obróbce numerycznej z wykorzystaniem specjalistycznych programów komputerowych.

Zwiększająca się ilość używanych w jednym badaniu znaczników utrudnia również sprawną detekcję odpowiednich struktur. Wykorzystując więcej niż je-

den barwnik trzeba dobrze je dobrać, uwzględniając intensywność emisji fluoroforów oraz możliwość nakładania się sygnałów świetlnych pochodzących od różnych barwników. Pierwsza dwukolorowa detekcja przeprowadzona została przez zespoły badawcze Hopmann i inni w 1986 r. [15].

Wykorzystanie mikrosensorów z FISH znajduje zastosowanie w badaniach aktywności biologicznej w biofilmach [4]. Cyanodityryl tetrazolium chloride [CTC] razem z FISH służy do wykrywania aktywności tlenowych bakterii. Przydatne przy ocenie wielu mikroorganizmów jednocześnie okazały się CLASI-FISH (acombinatorial labeling and spectral imaging), oraz DOPE-FISH (double labeling of oligonucleotide probes) [18], [5]. Jedną z najnowszych odmian jest RCA-FISH (rolling circle amplification) wykorzystana w celu detekcji genów odpowiedzialnych za proces denitryfikacji [18]. Prawdopodobnie najbezpieczniejsza z odmian jest FISH-BrdU [5-Bromo 2-deoxy-uridine] [12]. FISH-DVC (direct viable count) jest metodą stosowaną do badań wody z małą liczbą bakterii [10].

## 3. Podsumowanie

W inżynierii środowiska fluorescencyjna hybrydyzacja in situ jest wykorzystywana w celu oznaczania i wizualizacji gatunków organizmów (bakterii) w badanym środowisku. Stosowany jest do określenia morfologii i składu gatunkowego gleb, wód powierzchniowych [16], [2], morskich i oceanicznych bakterioplanktonu [11] oraz badaniach osadu czynnego i biofilmów powstających na powierzchniach kontaktujących się z wodami naturalnymi lub technologicznymi albo ściekami [17]. Dzięki FISH można dziś określać strukturę kłaczków i granul osadu czynnego [7]. Prowadzenie badań osadu czynnego jest utrudnione przez niepowtarzalność struktury osadu, rozbudowaną powierzchnię oraz niejednorodny prze-strzennie skład chemiczny i morfologiczny. Z tego powodu, jak do tej pory w literaturze przedmiotu, w porównaniu z ilością artykułów z zakresu badań medycznych z zastosowaniem metod FISH, artykułów z zakresu badań struktur osadu czynnego jest stosunkowo niewiele.